

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830041

研究課題名(和文) アミロイド前駆体タンパク質の細胞内輸送抑制によるアミロイドベータ産生阻害剤の探索

研究課題名(英文) Screenings of amyloid beta production inhibitor via suppression of intracellular amyloid precursor protein trafficking.

研究代表者

浦野 泰臣 (Urano, Yasuomi)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：00546674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病における老人斑の主要構成成分であるアミロイド (A β) は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) からセクレターゼによる切断により産生される。本研究ではコレステロールの脳特異的酸化物である24S-hydroxycholesterolが、APPの小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を抑制することで、A β 産生を抑制することを明らかにした。またクルクミン誘導体のスクリーニングを行い、セクレターゼを抑制せずにA β 産生を減少させる誘導体を同定した。その作用機序として、APP細胞内輸送の抑制であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A major pathological hallmark of Alzheimer's disease is the accumulation of Amyloid β (A β) in senile plaques. A β is generated from Amyloid precursor protein (APP) by cleavage with secretases. In this study, I found that the treatment with 24S-hydroxycholesterol, which is the brain-specific oxysterol, inhibited A β production by suppression of intracellular transport of APP from the endoplasmic reticulum to the Golgi. I also conducted in vitro screening of curcumin derivatives. I identified compound which inhibited A β production without affecting secretase activities via suppression of intracellular APP trafficking.

研究分野：生化学

キーワード：神経変性疾患 アルツハイマー病 細胞内輸送 クルクミン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) において老人斑の主要構成成分であるアミロイドβ (amyloid-β peptide, Aβ) の蓄積は AD 患者脳の初期の病変である。Aβは amyloid precursor protein (APP) からβセクレターゼおよびγセクレターゼによる切断により産生される。APPはセクレターゼによる切断を受ける前に、小胞体及びゴルジ体において N 型と O 型の糖鎖修飾を受ける。通常、小胞体からゴルジ体への順行輸送は、COPII 小胞を介して行われるが、APP においても新生 APP は COPII 小胞を介して小胞体からゴルジ体に輸送される。糖鎖修飾を受けた成熟型 APP は細胞表面に輸送され、αまたはβセクレターゼによる切断後、トランスゴルジネットワークやエンドソーム等においてγセクレターゼによる切断を受け Aβが産生される。すなわち細胞内における APP や各セクレターゼの細胞内局在や輸送は、APP 代謝において重要な役割を果たしている。しかし APP の初期輸送におけるコレステロール代謝の影響という観点からの解析はこれまで行われていない。

我々は脳特異的酸化ステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) に着目し解析を行ってきた。24S-OHC は cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) による酵素的な酸化でコレステロールから生成される酸化ステロールであり、CYP46A1 は主に神経細胞に発現している。血液脳関門によって末梢と隔てられた脳において、コレステロールは血液脳関門を通過できないため、通過可能な 24S-OHC は脳内のコレステロール恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。さらに 24S-OHC は AD への関連も示唆されており、初期の AD 患者の血漿中では 24S-OHC が増加し、後期 AD 患者血漿では減少することが報告されている。申請者の前所属である Dartmouth 大学の TY Chang 教授らはコレステロールのエステル化酵素である Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) のノックアウトマウスは、脳内で 24S-OHC が増加し、Aβ産生の減少や記憶力が改善することを報告している。また CYP46A1 を過剰発現したマウスでも Aβ産生が減少することが報告されており、24S-OHC が Aβ産生を抑制する効果が期待されるが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

これまで我々はヒト野生型 APP を発現する CHO 細胞 (CHO-APP) やヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、24S-OHC 処理は濃度依存的に Aβの産生を減少させることを既に見出している。また semi-intact 細胞を用いた独自の APP の初期輸送の再構築系を立ち上げ、24S-OHC 処理は APP の COPII 依存的細胞内輸送を減少させることを見出していた。さらに 24S-OHC は小胞体ストレス応答を介して、小胞体シャペロンで

ある Glucose-regulated protein 78 (GRP78) の発現を誘導し、小胞体で APP と GRP78 の複合体形成が亢進することを明らかにした。すなわち 24S-OHC は APP と GRP78 との結合増強を介して APP を小胞体にとどめ、セクレターゼが存在するゴルジ体以降のオルガネラへの輸送を減少させることで、Aβ産生を減少させるという仮説が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、24S-OHC による APP 細胞内輸送の抑制メカニズムの解明と、それを応用した Aβ産生阻害剤の探索を目的とする。目的 I) 24S-OHC によるセクレターゼ活性への影響の解析等、および APP の酸化ステロール応答部位の解析を介して、APP の細胞内輸送および Aβの産生に対する 24S-OHC による抑制メカニズムを明らかにする。

ウコンに含まれるポリフェノールであるクルクミンは、以前より Aβの蓄積を抑制する作用をもつことが知られているが、その詳しい細胞内作用機序は明らかにされていない。クルクミンは Aβに直接結合することや GRP78 の発現を誘導することも報告されていることから、24S-OHC と同様に、APP と GRP78 の相互作用増強を介して APP 細胞内輸送を抑制し、Aβ産生を阻害する可能性が考えられる。一方でクルクミン自身が細胞毒性をもつことも知られている。

そこで目的 II) として本学の杉本八郎教授が構築したクルクミン誘導体のライブラリーを用いてスクリーニングを行い、より細胞毒性の出ない低濃度で Aβ産生を抑制する誘導体を同定することを目的とする。また得られた誘導体について作用メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞としてヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞、ヒト野生型 APP が安定的に発現している CHO 細胞株 (CHO-APP) を用いた。クルクミン誘導体として同志社大学脳科学研究科の杉本八郎教授から提供された誘導体 10 種類について検討した。

(2) Aβ40、42 の定量は、Human Amyloidβ Assay Kit (IBL) によるサンドイッチ ELISA により定量した。

(3) 共免疫沈降法では、抗 APP 抗体と磁気ビーズ (Dynabeads) を用いて、全タンパク質溶出画分から免疫沈降を行い APP の精製を行った。その後、各種抗体を用いて Immunoblot 法により解析した。

(4) RNA 発現量は real-time PCR 法により定量した。タンパク質発現は Immunoblot 法により解析した。

(5) オルガネラの分画は、Optiprep を用いた密度勾配遠心法により行った。

(6) γセクレターゼ活性に対する抑制効果の判定は N-cadherin の切断を確認した。βセクレターゼ活性の測定はβセクレターゼアッセ

イキット (BioVision) を用いた。

(7) ヒト APP 変異体の作製は point-mutagenesis 法により CRAC モチーフに存在するアミノ酸を置換した。リポフェクション法により野生型 CHO 細胞に発現させ解析を行った。

4. 研究成果

(1) SH-SY5Y 細胞を 10 μ M 24S-OHC で 24 時間処理した細胞では、A β 40 の産生が減少し、未成熟型の APP が増加することが確認されていたことから、APP の切断酵素である β セクレターゼおよび γ セクレターゼ活性への影響を確認した。24S-OHC で処理した細胞の Lysate を用いて、in vitro assay により β セクレターゼ活性を測定したところ、24S-OHC は β セクレターゼ活性には影響を与えていなかった (Fig. 1A)。次に APP と同様に γ セクレターゼによって切断されることが報告されている N-cadherin について Immunoblot により判定した。 γ セクレターゼの阻害剤である DAPT 存在下では、N-cadherin の C-terminal fragment (CTF) の蓄積が観察されるのに対し、24S-OHC 処理下では、CTF のバンドが観察されなかった (Fig. 1B)。以上の結果から 24S-OHC は γ セクレターゼの他の基質の切断には影響を与えないことが示された。

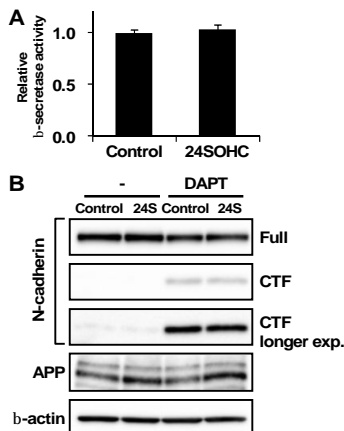


Fig. 1 セクレターゼ活性に対する 24S-OHC の効果. (A) in vitro β -secretase assay (B) N-cadherin の切断変化.

(2) 24S-OHC で処理した細胞ではセクレターゼ活性が抑制されていなかったことから、A β 産生は、阻害剤とは異なる機構により抑制されると考えられた。これまで 24S-OHC で刺激した細胞では小胞体存在すると考えられる未成熟型 APP が蓄積し、小胞体シャペロンである GRP78 との結合が増加していることが明らかにされていることから、APP の細胞内局在を密度勾配遠心法により解析した。この方法では小胞体マーカーである Ribophorin-1 や GRP78 はフラクション 5-7 に回収される (Fig. 2)。一方ゴルジ体やエンドソームはフラクション 2-4 に回収

される (data not shown)。APP については未成熟型 APP がフラクション 5-7 に回収されるのに対し、ゴルジ体以降のオルガネラに局在するとされる成熟型 APP はフラクション 4 にピークが現れたことから、分画が成功していると考えられる。本条件において 24S-OHC 処理した細胞を分画すると、増加した未成熟型 APP がおもにフラクション 5-7 に回収されていた。以上の結果とこれまで得られていた結果から、24S-OHC は、小胞体ストレス応答による GRP78 の発現誘導および APP/GRP78 複合体の形成亢進を起こすことで、APP の COP-II 小胞を介した小胞体からゴルジ体への輸送を阻害すると考えられた。また 24S-OHC は A β 産生酵素であるセクレターゼ活性を抑制せず、セクレターゼが存在するゴルジ体以降のオルガネラに APP が到達しないことから、A β 産生量が減少する可能性が示唆された。これらの結果をまとめた報告が FASEB Journal に掲載された。

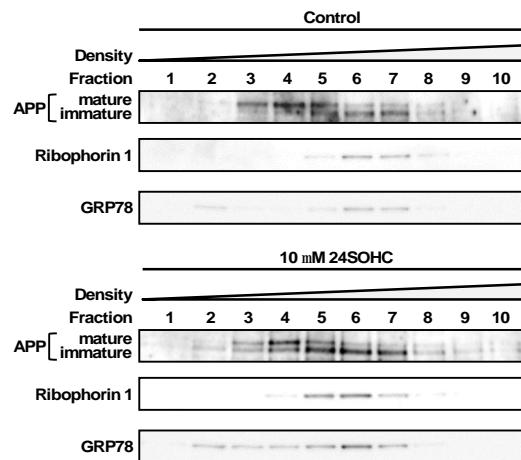


Fig. 2 密度勾配遠心法による APP の細胞内局在解析.

(3) 24S-OHC によって未成熟型 APP が小胞体に蓄積する原因として、APP に 24S-OHC が直接的に結合することによって折り畳み不全となり、小胞体からの輸送が減少するという可能性が考えられた。そこでヒト APP のステロール結合部位と推定される VGSNK 配列のうち、バリン、セリン、リジンそれぞれアラニンに置換した変異体を作製し、さらに野生型 CHO 細胞に遺伝子導入し、各変異体を安定的に発現する細胞株を樹立した。A β の定量を定量したところ VGSNK 配列のうちセリン、リジンが 24S-OHC による A β 産生メカニズムにおいて重要な役割を果たす可能性が示されたが、APP の発現量が低く、産生される A β 量も少なかったことから、より高発現系の確立が重要と考えられた。

(4) クルクミン誘導体のライブラリーから、クルクミン及び誘導体 10 種類について CHO-APP 細胞を用いて 24 時間処理した細

胞について、 $A\beta$ 産生を評価した。その結果、クルクミンよりも $A\beta_{40}$ 産生の抑制効果が高い誘導体 X を同定した (Fig. 3A)。誘導体 X で処理した細胞では全長の APP の増加が確認された (Fig. 3B)。処理時間を 72 時間まで延長した場合、 $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ がそれぞれ 60% まで減少していた (Fig. 3C)。また全長の APP や他の切断産物である secreted APP が減少していることが確認された (Fig. 3D)。細胞毒性の解析では、誘導体 X は $A\beta$ 産生を抑制する濃度では細胞生存率に影響を与えないことが確認された。

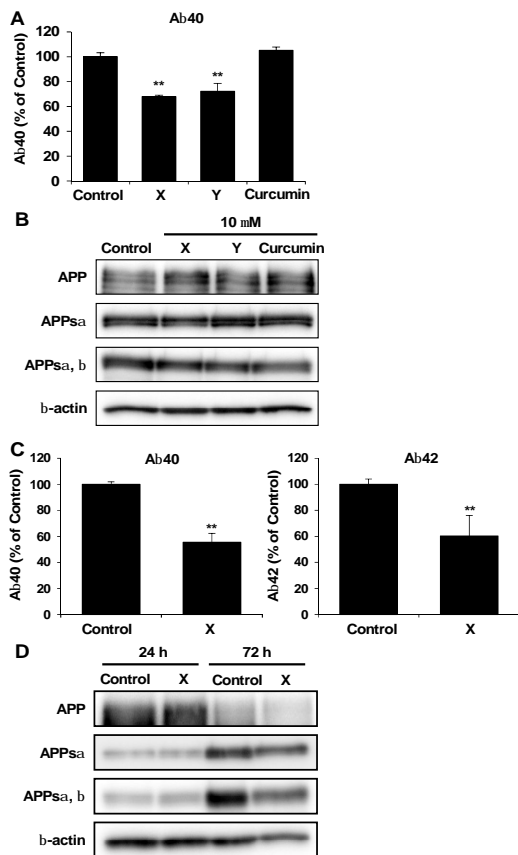


Fig. 3 CHO-APP 細胞における誘導体 X の効果. (A and B) 誘導体 X および Y で 24 時間処理した細胞における (A) $A\beta_{40}$ 産生量および (B) イムノプロットング. (C and D) 誘導体 X で 72 時間処理した細胞における (C) $A\beta$ 産生量および (D) イムノプロットング.

神経細胞を用いた解析では、誘導体 X で 24 時間処理した細胞において $A\beta_{40}$ 産生の減少と共に、未成熟型 APP 量の増加が確認された (Fig. 4A)。APP mRNA レベルには影響を与えていなかった。また誘導体 X は β セクレターゼ活性を阻害するような影響を与えていなかった (Fig. 4B)。N-cadherin の切断から γ セクレターゼ活性について判定したところ、阻害されていなかった (Fig. 4C)。免疫沈降法を用いた解析から、小胞体シャペロンである GRP78 と APP の結合の増加が確認された (Fig. 4D)。以上の結果から、小胞

体で翻訳された新生 APP がセクレターゼの存在するゴルジ体やエンドソームへの細胞内輸送される過程を、クルクミン誘導体 X が抑制したことにより、間接的に $A\beta$ 産生を減少させたのではないかと考えられた。セクレターゼは APP 以外にも多くの基質をもつことからセクレターゼの直接的な活性阻害は副作用が起きてしまうが、誘導体 X はセクレターゼ活性に影響を与えず $A\beta$ 産生を抑制出来ることから、AD 治療薬として有効となることが期待される。

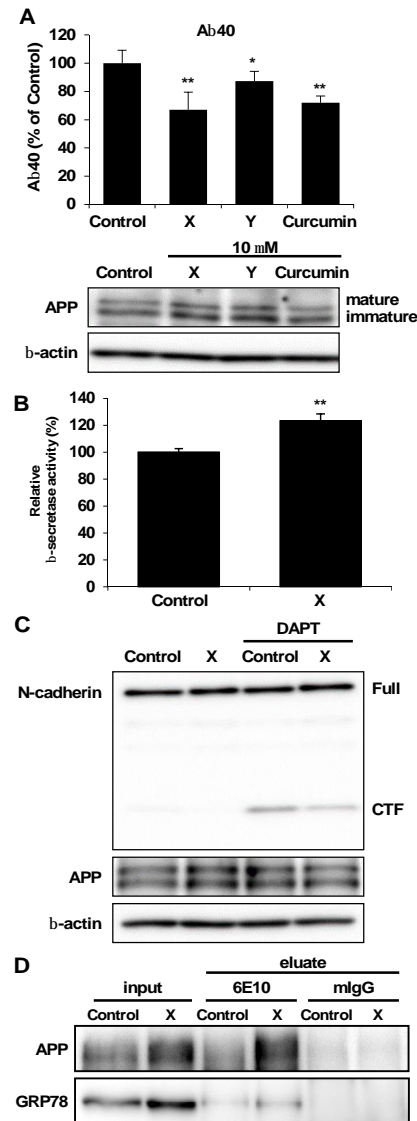


Fig. 4 SH-SY5Y 細胞における誘導体 X の効果. (A) 誘導体 X および Y で 24 時間処理した細胞における $A\beta_{40}$ 産生量およびイムノプロットング. (B) in vitro β -secretase assay (C) N-cadherin の切断変化. (D) 抗 APP 抗体を用いた免疫沈降実験.

(5) また計画以上の発見として過剰量の 24S-OHC は神経細胞に Necroptosis という細胞死形態を引き起こし、その原因として 24S-OHC のエステル化が重要であることを報告した。すなわち脳内で 24S-OHC は低濃度では $A\beta$ 産生抑制等の細胞保護効果、高濃度では細胞死誘導作用があることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Vo DK, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N., 24(S)-Hydroxycholesterol induces RIPK1-dependent but MLKL-independent cell death in the absence of caspase-8., *Steroids*, 2015, in press. 査読有

doi: 10.1016/j.steroids.2015.02.007.
Noguchi N, Saito Y, Urano Y., Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014, Vol 446, pp 692-696. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.010.

Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N., Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1., *Cell Death Dis.*, 2014, Vol 5, pp e990. 査読有

doi: 10.1038/cddis.2013.524.

Okabe A, Urano Y, Itoh S, Suda N, Kotani R, Nishimura Y, Saito Y, Noguchi N., Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death., *Redox Biol.*, 2013, Vol 2, pp 28-35. 査読有

doi: 10.1016/j.redox.2013.11.007.

Urano Y, Ochiai S, Noguchi N., Suppression of amyloid- production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking., *FASEB J.*, 2013, Vol 27, pp. 4305-4315. 査読有

doi: 10.1096/fj.13-231456.

[学会発表](計 5件)

小谷理奈, 浦野泰臣, 杉本八郎, 野口範子, Amyloid 産生抑制効果を有するクルクミン誘導体の作用機序の解明, 第37回日本分子生物学会, 2014.11.27, パシフィコ横浜(神奈川県)

Noguchi N., Vo DK., Takabe W., Urano Y., Saito Y., Mechanisms of neuronal cell death induced by 24(S)-hydroxycholesterol, 4th The European Network for Oxysterol Research Symposium, 2014.9.18, COIMBRA (ポルトガル)

浦野泰臣, 山中一哲, 高部稚子, 齋藤芳郎, 野口範子, 脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による細胞死メカニズムの解析, 第23回日本 Cell Death 学会学術集会, 2014.7.18, 東京医科歯科大学(東京)

小谷理奈, 浦野泰臣, 杉本八郎, 野口範子, Amyloid 産生を抑制するクルクミン誘導体の同定とそのメカニズムの解明, 第36回日本分子生物学会, 2013.12.3, 神戸ポートアイランド(兵庫)

Noguchi N., Yamanaka K., Takabe W., Urano Y., Saito Y., Novel insights of brain-specific produced oxysterol in neurodegenerative diseases., 第86回日本生化学会, 2013.9.13, パシフィコ横浜(神奈川県)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 泰臣 (URANO YASUOMI)
同志社大学・生命医科学部・助教
研究者番号: 00546674

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: